

**UNIVERSITA' DI PISA**



**Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali**

**Corso di Laurea Magistrale in Produzioni Agroalimentari e Gestione degli  
Agroecosistemi *curriculum* Produzioni Agroalimentari**

**TRATTAMENTI DI PRIMING ED OSMOPRIMING SU  
ALCUNE SPECIE AROMATICHE**

**Relatore:**

Chiar.mo Prof. Mario Macchia

**Candidata:**

Stefania Manzo

**Correlatore:**

Chiar.mo Prof. Galileo Magnani

**Anno Accademico 2012/2013**

## **INDICE**

### **CAPITOLO 1**

<b>Introduzione</b>	<b>Pag. 3</b>
<b>1.1 Germinazione e priming</b>	<b>Pag. 4</b>
1.1.1 Curva d'imbibizione	<b>Pag. 5</b>
<b>1.2 Effetti del priming a livello biochimico</b>	<b>Pag. 7</b>
<b>1.3 Priming e conservabilità dei semi</b>	<b>Pag. 11</b>
<b>1.4 Tecniche di priming</b>	<b>Pag. 16</b>
1.4.1 Priming con fitormoni	<b>Pag. 17</b>
1.4.2 Idropriming	<b>Pag.18</b>
1.4.3 Matric priming	<b>Pag. 20</b>
1.4.4 Osmopriming	<b>Pag. 21</b>

### **CAPITOLO 2**

<b>2.1 Scopo della tesi</b>	<b>Pag. 30</b>
-----------------------------	----------------

### **CAPITOLO 3**

<b>3.1 Materiali e metodi</b>	<b>Pag. 32</b>
3.1.1 Trattamenti di priming	<b>Pag. 34</b>
3.1.2 Analisi statistica	<b>Pag. 36</b>

<b>3.2 Risultati e discussione</b>	<b>Pag. 37</b>
<b>3.2.1 Analisi dell'interazione specie x trattamento</b>	<b>Pag. 42</b>
<b>CAPITOLO 4</b>	
<b>4.1 Considerazioni conclusive</b>	<b>Pag. 48</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>Pag. 50</b>

## **Introduzione**

La germinazione è il primo stadio della crescita vegetativa delle piante e rappresenta una fase delicata del processo di produzione. Il processo di germinazione è fortemente influenzato sia dalle condizioni ambientali, in particolare da temperatura e umidità del suolo, sia dalle caratteristiche qualitative delle sementi, le quali presentano un determinato tempo medio di germinazione, o energia germinativa; aspetti, questi, strettamente connessi alle modalità di conservazione delle sementi oltre che alle caratteristiche intrinseche della specie: nello specifico, la conservazione mira al mantenimento della vitalità e dell'integrità fisica delle sementi.

L'intervallo di tempo tra semina e germinazione del seme risulta essere un aspetto di particolare rilevanza nell'ambito del processo di produzione; soprattutto per quelle specie che presentano tempi di germinazione piuttosto lunghi, riuscire ad accorciare l'intervallo tra semina ed emergenza della plantula rappresenta un elemento di notevole importanza, che apporta dei vantaggi quali quello di poter completare il ciclo di produzione delle piante in tempi più brevi e, di conseguenza, la possibilità di operare un numero maggiore di cicli di produzione in tempo più breve. Inoltre, proprio accorciando la fase dell'emergenza, si riescono ad ottenere risultati notevoli come una produzione più uniforme e qualitativamente migliore.

## **1.1 Germinazione e priming**

Sin dall'antichità la pratica di trattare i semi prima della semina, per ridurre l'intervallo di tempo tra semina ed emergenza e per migliorare l'uniformità di emergenza delle plantule in specie annuali e perenni, era nota. Evenari (1980) ha riportato che gli antichi agricoltori greci immergevano i semi di cetriolo in acqua o latte e miele prima di effettuare la semina per incrementare il tasso di germinazione e di emergenza. Nel XVII secolo, in Russia, effettuare trattamenti in pre-semina con soluzioni saline era pratica comune. Un report di Wilknsn (1918) (Perera et al., 1994) raccomandava di trattare i semi di radicchio, fagiolo, mais, cetriolo e zucchini con acqua tiepida per tutta la notte per aumentare la velocità di germinazione. (Perera et al., 1994).

Oggigiorno, nell'ambito della tecnologia sementiera, il ricorso a metodi finalizzati ad ottenere un raccorciamento e una maggiore uniformità della fase di germinazione risulta sempre più diffuso; tra questi sono comprese le tecniche di pregerminazione, che consentono di ottenere dei semi che hanno già compiuto il processo germinativo (se non totalmente, almeno in parte), garantendo un'emergenza rapida ed omogenea anche in presenza di condizioni sfavorevoli.

Tra i vari trattamenti pregerminativi, il priming è un procedimento che prevede l'idratazione controllata (Pill, 1995), in modo da far attivare i processi metabolici pregerminativi - rottura della dormienza, idrolisi o mobilitazione di inibitori, imbibizione e attivazione di enzimi - (Khalil et al, 2010; Khan et al, 2008) senza far raggiungere lo stadio di emergenza radicale (Jett et al., 1996).

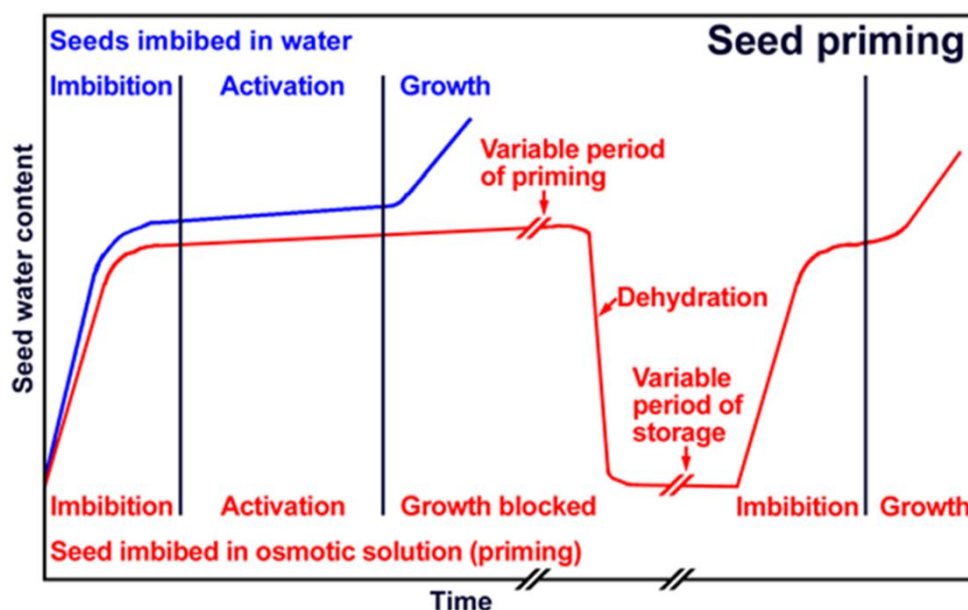
Il vantaggio, dunque, apportato dalle tecniche di priming è che, una volta seminati, i semi presentano un'emergenza più veloce e uniforme (Nath et al., 1991; . Khan, 1992; Braccini et al., 1997), poiché avendo completato (o quasi) il processo germinativo in senso stretto, la comparsa della radichetta (che rappresenta la cosiddetta germinazione visibile) avviene più rapidamente. Oltre a migliorare le prestazioni di germinazione, il priming potrebbe anche migliorare la tolleranza del seme alla salinità, alla siccità o a temperature sub-ottimali. Il segreto della buona riuscita del priming sta nell'interrompere il trattamento proprio al momento giusto per permettere l'essiccamento, che consente la continuazione delle attività metaboliche per la germinazione, ma impedisce l'emergenza radicale. I semi vengono, infatti, essiccati dopo il priming per consentirne la conservazione, per periodi di tempo variabili a seconda della specie, a livelli di umidità compatibili con la conservazione e per mantenere gli effetti benefici del trattamento, cercando di minimizzare la perdita di qualità causata dal processo di deterioramento delle sementi.

### **1.1.1 Curva d'imbibizione**

Per definizione, la germinazione incorpora quegli eventi che iniziano con l'assorbimento di acqua da parte del seme secco dormiente e terminano con l'allungamento dell'asse embrionale (Bewley e Black, 1994). L'assorbimento di acqua nel seme segue un modello trifasico, con una fase iniziale di assorbimento rapido nota come imbibizione (fase I) seguita da una fase di plateau (fase II) in cui ha luogo

il processo di attivazione metabolica e in cui si completa la germinazione in senso stretto, e un secondo aumento di assorbimento di acqua associato alla fuoriuscita della radichetta (fase III). Durante ogni fase, l'assorbimento di acqua è regolato dalla disponibilità di acqua nel seme. In regime di priming, il potenziale idrico del seme è ad un livello sufficiente per portare avanti gli eventi metabolici in fase II, ma, come già accennato, viene impedita comparsa della radice (Simon, 1984).

Lo studio della curva di imbibizione risulta molto importante, in particolare per lo sviluppo di tecniche di pregerminazione volte a migliorare la qualità fisiologica del seme (Lopes et al., 2000). Il modello trifasico ha implicazioni profonde per la vitalità delle sementi, infatti il seme tollera il ritorno all'umidità iniziale necessaria per la conservazione (cioè l'essiccazione) quando è in fase I o II; la fase III risulta essere uno stadio troppo avanzato per permettere un'asciugatura del seme senza arrecare danni all'embrione (Taylor et al., 1998). Secondo il modello trifasico, a livello biochimico, l'inizio della germinazione è associato ad una rapida sintesi di RNA e di proteine, per svolgere i processi riparativi prima dell'inizio della replicazione del DNA (Osborne, 1983). Come mostrato nella figura sottostante, in un processo di germinazione con priming, la fase II viene estesa, rispetto ad un normale processo germinativo, per un certo periodo di tempo, in cui l'assorbimento di acqua è controllato e risulta rallentato (Varier et al., 2010), senza portare alla fuoriuscita della radichetta (fase III). Alla semina, le sementi devono essere in grado di imbibirsi in modo da sviluppare prontamente la radichetta.



*Figura 1: confronto tra processo germinativo in condizioni standard e in condizioni di priming, essiccazione e conservazione.*

*(Da: Gerard Leubner; "The Seed Biology Place" <http://www.seedbiology.de/seedtechnology.asp>)*

## 1.2 Effetti del priming a livello biochimico

Gli effetti positivi del priming sulla germinazione di molte specie sono attribuibili, a livello biochimico, all' induzione di meccanismi di riparazione cellulare: la ripresa delle attività metaboliche è in grado di ripristinare l'integrità cellulare, attraverso la sintesi di acidi nucleici (DNA e RNA), proteine (Bewley e Black, 1994) e il miglioramento del sistema antiossidante di difesa. Secondo alcuni studi infatti l'idratazione delle sementi fino alla fase II (ma non oltre) permette una replicazione del DNA anticipata, un aumento dell'RNA e della sintesi proteica (Fu et al., 1988), (Bray et al., 1989), (Ibrahim et al., 1983), una maggiore disponibilità di ATP (Mazor et al., 1984), una crescita più rapida dell'embrione (Dahal et al., 1990), la riparazione



di parti di semi deteriorate (Karssen et al., 1989; Saha et al., 1990). Questi effetti stimolano la fuoriuscita della radichetta abbreviando così il tempo di germinazione dei semi.

Garantire l'integrità del DNA è un fattore di fondamentale importanza per evitare errori di replicazione e di sintesi del DNA stesso. Un forte aumento nella sintesi di DNA avviene solo alla fine della germinazione (fase III) sia nel seme sottoposto a priming che nel seme non trattato, come mostrato in semi di frumento (Dell'Aquila et al., 1986). Gli studi successivi hanno mostrato alcuni effetti del priming sulla sintesi di DNA anche durante la fase II. Su porro sottoposto a priming è stato evidenziato un aumento, se pur piccolo, del contenuto di DNA nell'embrione durante questa fase, a causa della replicazione di plastidi e DNA mitocondriale per i processi di riparazione cellulare (Osborne, 1983). Successivamente, un aumento DNA è stato osservato 14 giorni dopo il trattamento sia nei semi trattati e non, quando i semi avevano raggiunto la fase di germinazione irreversibile (Bray, 1995). Risulta inoltre che la riparazione in fase di pre-replicazione del DNA danneggiato favorisca la sintesi di nuovo DNA (Varier et al., 2010). Un'ulteriore prova degli effetti positivi del priming sul DNA è data da uno studio di Thornton et al. (1993) su cavolo, in cui l'idratazione controllata e areata ha determinato un anticipo nella sintesi di DNA. Nonostante il suo ruolo cruciale, la quantità di DNA che è necessaria nei processi di riparazione rappresenta solo il 20-30 % del DNA totale sintetizzato durante il priming; il resto è rappresentato principalmente da DNA mitocondriale. È stato rilevato, infatti, un rapido aumento del numero di mitocondri durante il priming in semi di porro (Ashraf et al., 1993). Oltre alla sintesi del DNA per i processi di riparazione e per plastidi e

mitocondri, in diverse specie come pomodoro (Lantieri et al., 1994; Ozbingol et al., 1999), peperone (Lantieri et al., 1993, 1994) e barbabietola da zucchero (Redfearn et al., 1997), è stata osservata una sintesi di DNA per la divisione cellulare. Il potenziamento della replicazione del DNA durante il priming dipende dalla specie, dalla cultivar, dalla qualità del lotto di seme (Lantieri et al., 1994) e dalle condizioni di trattamento (Ozbingol et al., 1999). Il priming di per sé non ha alcun effetto diretto sulla divisione cellulare, ma ne innesca l'inizio (fase G1 e G2 della mitosi) dalla fase II alla fase III di imbibizione del seme (Ozbingol et al., 1999). Questo progresso è reso possibile da un accumulo di  $\beta$ -tubuline, che sono proteine coinvolte nel mantenimento del citoscheletro e nella formazione dei microtubuli necessari per la divisione cellulare (De Castro et al., 2000). L'accumulo di tubulina durante la fase II della germinazione comporta la simultanea divisione delle cellule nella successiva fase III.

È stato evidenziato che il priming, in particolare l'osmopriming, aumenti il contenuto di RNA nell'embrione e nei tessuti di riserva di porro (Bray et al., 1989), pomodoro (Coolbear et al., 1979) e lattuga (Khan et al., 1980). Bray et al. (1989) hanno dimostrato che questo accumulo riguardava RNA ribosomiale (rRNA) in un turnover (RNA ribosomiale 85 % dell' RNA totale) tra riparazione di rRNA danneggiato e sintesi di nuovo rRNA, il quale risulta necessario quanto il DNA nella riparazione dei danni cellulari. Il priming consente il recupero dell'integrità dell'RNA (Coolbear et al., 1990), che a sua volta garantisce una corretta codifica degli amminoacidi per la sintesi di proteine durante la germinazione dei semi. La sintesi proteica, un requisito essenziale per la germinazione, inizia alcuni minuti dopo l'imbibizione (Cheung et

al., 1979). In questa fase, il priming deprime la sintesi proteica nell'embrione e nei tessuti di riserva ma induce ad un aumento della sintesi nella successiva fase di germinazione. A tal riguardo Bray (1995) ha riscontrato che la quantità di proteine sintetizzate osservata 2 giorni dopo la germinazione in semi di porro sottoposti a priming era la stessa di quella osservata 4 giorni dopo la germinazione in semi non trattati. Chen et al. (2011) hanno osservato un aumento di deidrina in spinacio durante il trattamento di osmopriming. Il priming non sembra comunque indurre la sintesi di proteine specifiche, come è stato dimostrato dall'analisi del modello qualitativo delle proteine su semi di pisello (Dell'Aquila et al., 1989). Riguardo l'attività enzimatica, il priming sembrerebbe contribuire al rafforzamento del sistema enzimatico volto a contrastare il deterioramento dei semi durante la conservazione, il quale è associato all'accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reacting Oxygen Species), come il perossido di Idrogeno ( $H_2O_2$ ), anione superossido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e il radicale idrossile ( $OH^\bullet$ ). Le ROS reagiscono con la maggior parte delle molecole organiche, causando ossidazione e carbonilazione di residui amminoacidici e mutazione del DNA (Bailly, 2004), e la reazione con acidi grassi polinsaturi presenti nelle membrane cellulari, portando alla perossidazione lipidica e alla conseguente compromissione dell'integrità della membrana (Bailly et al., 1998). Gli enzimi antiossidanti, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT) e la glutazione reduttasi (GR), fanno da "spazzini" delle ROS, (Bailly et al., 1998). Il priming, come già accennato, sembra rafforzare questo sistema di difesa. Infatti il trattamento è stato associato ad un aumento dell'espressione della CAT in *Arabidopsis* (Gallardo et al., 2001) e girasole (Kibinza et al., 2011) e dell'attività della CAT in soia (Posmyk et al.,

2001) e in semi di mais (Chiu et al., 2002). In semi di girasole, Bailly et al. (1998, 2000) avevano precedentemente dimostrato che l'osmoprimering con PEG ha portato ad un aumento della SOD oltre che della CAT, in risposta all'aumento dell'attività metabolica durante il priming. Appare inoltre che il sistema degli enzimi antiossidanti è migliorato in risposta ad una maggiore quantità di potenziali stress. È stata mostrata una rilevante diminuzione di Malonildialdeide (MDA), un prodotto della perossidazione lipidica: -20% in echinacea (Chiu et al., 2006) e -40% in spinacio (Chen et al., 2011). Oltre alla riduzione di MDA, anche la SOD, la CAT e le concentrazioni di GR in echinacea sono state aumentate con il priming (Bailly et al., 1998 e 2000).

Da tutti questi indizi si può concludere che i processi attivati dal priming, coinvolgendo acidi nucleici, proteine ed enzimi, sono concepiti per indurre resistenza a molteplici sollecitazioni e si traducono in una germinazione più vigorosa, riducendo così il tempo di emergenza e promuovendo precocemente lo sviluppo della pianta.

### **1.3 Priming e conservabilità dei semi**

Il seme, essendo un'entità vivente, è destinato a perdere la vitalità a causa di fattori estrinseci ed intrinseci (Roberts, 1972). Il potenziale di conservazione delle sementi è principalmente un fattore genetico, ma è influenzato comunque dall'ambiente (Wittington, 1978), dalla specie (Chauhan et al, 1984;. Singh et al., 1994), dal periodo di conservazione (Reddy, 1985) e dalle condizioni sanitarie delle sementi. Il

deterioramento del seme è un processo inevitabile ed irreversibile e principalmente dipende dalla composizione fisica e chimica delle sementi e dalla loro condizione fisiologica (Delouche, 1973). Sia le modalità e la durata dell' essiccazione che le condizioni e la durata della conservazione possono alterare i vantaggi conseguiti con il priming. Atherthon et al (1983) hanno riscontrato che semi di spinacio sottoposti a priming hanno mantenuto un'elevata germinabilità a temperature alte dopo un mese di conservazione. Odell et al. (1986) hanno sottoposto a priming e successivamente conservato (a 10°C e a 45% di umidità) semi di pomodoro per 3, 7, 10 e 19 mesi e hanno esaminato la germinazione a 25° e 35° C. A 25°C la germinazione dopo 10 mesi di conservazione era simile alla germinazione di semi non conservati; tuttavia dopo 7 mesi di conservazione in condizioni di germinazione non ottimali (a 35°C), i semi hanno avuto una diminuzione della percentuale di germinazione. Akers et al. hanno riportato che l'effetto del priming con PEG 8000 su prezzemolo non è stato compromesso dopo 8 mesi di conservazione. Anche semi di porro e carota trattati con PEG e conservati a 10°C per 12 mesi hanno mantenuto tutti i vantaggi conseguiti durante il trattamento di priming.

È stata riportata una correlazione tra soluzione osmotica utilizzata durante il trattamento e conservabilità del seme. Semi di pomodoro trattati con  $\text{KNO}_3$  hanno avuto una minore tolleranza alle alte temperature (30°C) rispetto a semi trattati con PEG (Alvarado et al., 1988). Peperoni sottoposti a priming conservati a 35° per 6 mesi hanno avuto una maggiore percentuale di germinazione rispetto al controllo (Georghiu et al., 1987). Sempre su peperone, Thanos et al. (1989) hanno conservato semi non trattati per 3 anni, e questi hanno mantenuto un' elevata germinabilità

durante tutto il periodo di conservazione a 5°C, al contrario dei semi conservati per lo stesso periodo a 25°. I semi sottoposti a priming prima della conservazione hanno avuto un alto livello di germinabilità ad entrambe le condizioni di temperatura; al contrario semi di salvia trattati e conservati a 5°C per 8 mesi hanno avuto una riduzione nella germinazione; in questo esperimento, una bassa o alta umidità relativa di conservazione rispetto al range del 50-70%, ha accelerato il deterioramento dei semi. Non sono stati riportati cambiamenti nella germinabilità di *Senecia Cineraria* trattata (Carpenter, 1990) dopo 16 settimane di conservazione a 5° ad una umidità del 52%. Semi di anguria sottoposti ad osmopriming hanno avuto una rapida germinazione dopo 20 settimane di conservazione a secco (Sachs, 1977).

La vitalità e il tasso di germinazione di semi di cipolla non sono stati modificati dopo 18 mesi di conservazione a 10 °C (Dearman et al., 1986).

Han (2003) ha riscontrato che i semi di cipolla sottoposti ad osmopriming hanno avuto una germinazione più uniforme di semi non trattati, sia prima che dopo la conservazione per 2 mesi a 5 e 15 ° C.

Filho (2008) ha osservato su semi di cavolfiore che in condizioni controllate (a 20 ° C, 50% di umidità relativa) i vantaggi del priming seguito da essiccamento veloce, possono essere mantenuti oltre 4 mesi di stoccaggio. In un recente esperimento su cipolla condotto da Dorna et al. (2013), è stato osservato che la conservazione fino a 6 mesi, indipendentemente dalla temperatura, è abbastanza sicura per la vitalità dei semi di cipolla trattati, sebbene il rischio di perdere i benefici ottenuti durante il priming è aumentato il con prolungamento del periodo di conservazione. È stato

inoltre osservato nell'esperimento che semi sottoposti ad idropriming sembrano essere meno sensibili a una temperatura più alta di conservazione rispetto alle sementi sottoposte ad osmopriming.

Come già accennato, la durata e la modalità di essiccazione influenzano la longevità del seme. Gurusinghe e Bradford (2001) hanno evidenziato che una rapida essiccazione può modificare il contenuto di carboidrati solubili e a sua volta ridurre la tolleranza all'essiccazione e la longevità dei semi. Al contrario, una lenta essiccazione può migliorare la longevità dei semi dopo la loro fase di riempimento (Bruggink et al., 1999). Pertanto, i due aspetti della tolleranza all'essiccazione e longevità dei semi sono chiaramente correlati (Ellis et al., 1994; Hay et al., 1995) . Gli zuccheri e i loro derivati svolgono un ruolo importante nella tolleranza all'essiccazione e nella longevità dei semi (Horbowicz et al., 1994; Brenac et al., 1997; Obendorf et al., 1998), dal momento che sono presumibilmente coinvolti nel mantenimento dell'integrità della membrana (Crowe et al., 1988.; Hoekstra et al., 1992; Oliver et al., 1998) e della struttura tridimensionale delle proteine (Crowe et al., 1992; Wolkers et al., 1998) durante l'essiccazione.

Gli zuccheri che giocano questo ruolo sono il saccarosio e qualche oligosaccaride quali raffiniosio, stachiosio e verbascosio (Obendorf, 1997). Questi zuccheri interagiscono con i lipidi e proteine della membrana cellulare formando glicolipidi e glicoproteine, rispettivamente. Inoltre, formano uno strato vetroso a livello della membrana (Leprince et al., 1993), per contrastare il deterioramento durante l'essiccamento e lo stoccaggio (Gurusinghe et al., 2001) . Durante l'idratazione, gli Oligosaccaridi sono i primi zuccheri ad essere metabolizzati; il loro consumo durante

il priming e la mancanza di accumulo durante il successivo essiccamento sono responsabili di una ridotta formazione dello strato vetroso, risultante in deterioramento accelerato (Gurusinghe et al., 2001). In sostegno a questa ipotesi, Gurusinghe e Bradford (2001) hanno riscontrato una diminuzione nella concentrazione di saccarosio e raffiniosio con una maggiore durata dell' idropriming in semi di lattuga. Inoltre nella stessa ricerca il valore di p50, un indice di longevità che rappresenta il numero di giorni di invecchiamento necessario a ridurre la vitalità delle sementi del 50 %, era direttamente collegato alla concentrazione di saccarosio e raffiniosio, il che significa che ad un maggior contenuto di tali zuccheri corrisponde una maggiore longevità. Oltre agli zuccheri, le proteine possono agire per aumentare la tolleranza all'essiccazione durante questa procedura. In semi di cavolo, un essiccamento lento è stato associato ad un aumento dell'espressione di due geni di tolleranza allo stress (Soeda et al., 2005). Questi geni, EM6 e RAB 18, codificano proteine appartenenti al gruppo LEA (Late Embryogenesis Abundant ), indotto da vari stress e conferisce tolleranza all'essiccazione durante la maturazione del seme. EM6 e RAB 18 erano espressi in misura minore in seguito ad una rapida asciugatura dopo il priming (Soeda et al., 2005) . In semi di pomodoro si è visto un trattamento post - priming di 2-4 h a 30 o 40 ° C si è rivelato un modo per ripristinare la longevità (Gurusinghe et al., 2001; Gurusinghe et al., 2002) . Questo trattamento è stato accompagnato da un aumento di proteine BiP (Immunoglobuline Binding Protein), un altro gruppo che contribuisce a ripristinare le funzioni delle proteine danneggiate dai processi di imbibizione delle sementi e dalla successiva essiccazione (Gurusinghe et al., 2002) .



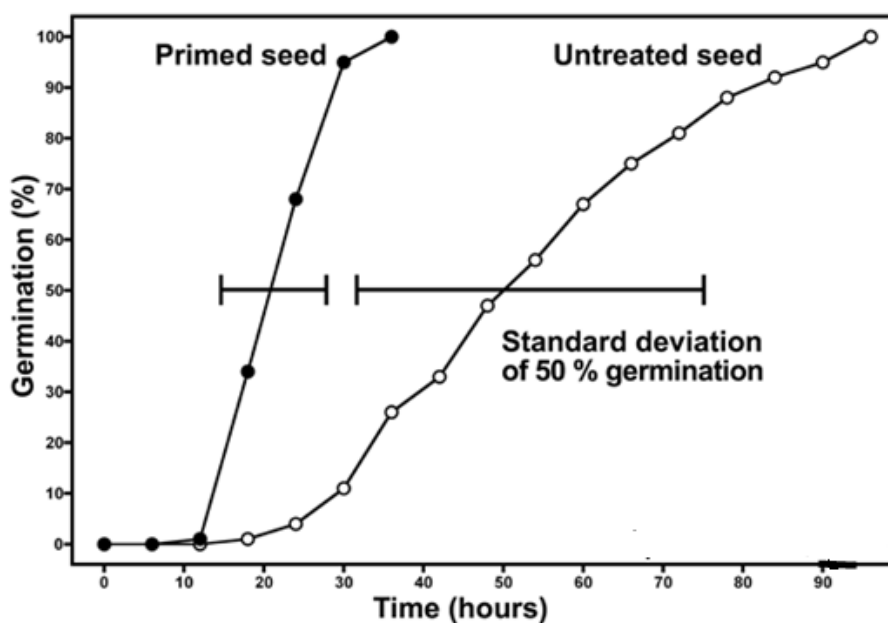
## 1.4 Tecniche di priming

I principali metodi di priming consistono nei seguenti trattamenti, che prevedono:

- ❖ uso di sola acqua per l'imbibizione (idropriming);
- ❖ uso di matrici solide idratate o impregnate con soluzioni osmotiche, come sabbia idratata, torba e vermiculite o cotone imbevuto con soluzioni osmotiche (matric-priming);
- ❖ uso di soluzioni osmotiche con polietilenglicole (PEG), mannitolo o sali inorganici (osmopriming);
- ❖ uso di soluzioni con fitormoni (i più usati sono le gibberelline).

Ci sono più segnalazioni circa gli effetti delle varie tecniche di priming su semi di specie diverse. Come già accennato, il priming può aumentare la tolleranza alla siccità, ridurre i danni da parassiti e aumentare la resa delle colture in cereali e legumi (Harris et al, 2000; Khan et al, 2005) Dell'Aquila e Tritto (1990) hanno riscontrato che i semi di frumento sottoposti a priming sia con acqua che con soluzione osmotica sono germinati 12h prima dei semi non trattati. E 'stato riportato che le varie tecniche di priming su girasole hanno avuto un effetto significativo sulla percentuale di germinazione, hanno incremento la velocità di germinazione e il peso secco delle piantine e hanno diminuito la percentuale di piantine anormali in condizioni di siccità. (Demir et al, 2006). Arif et al. (2008) hanno evidenziato che i

trattamenti di priming su semi di soia hanno in generale migliorato emergenza delle plantule e hanno apportato un miglioramento della resa.



*Figura n.2: effetto del priming su tempo e percentuale di germinazione.*  
(<http://generalhorticulture.tamu.edu/HORT604/LectureSupplMex07/SeedGermPrimeDormancy.htm>)  
Copyright 2006, G. Leubner, "The seed Biology Place")

#### 1.4.1 Priming con fitormoni

Nel priming con fitormoni i semi vengono imbibiti con una soluzione acquosa di fitormoni; l'ormone più utilizzato è l'acido gibberellico in concentrazioni variabili. In un esperimento condotto nel 2013 da Azadi et al., il priming ormonico ha migliorato le caratteristiche germinative e l'attività enzimatica di semi di sorgo sottoposti a un processo di deterioramento accelerato per testarne il vigore e la

qualità. Anche altre ricerche mostrano che il priming con Gibberelline aumenta la germinabilità di cereali, come nel caso del frumento (Tabatabae, 2013). In molti esperimenti sono state utilizzate elevate concentrazioni di Gibberelline e la più alta germinabilità è stata riscontrata ad una concentrazione di 20 ppm (Naaem et al, 2006). Hay et al (1986) hanno riscontrato un incremento nella percentuale di germinabilità in semi di carota sottoposti a priming con Gibberelline; Lada et al (2004) hanno riportato che il priming ormonale ha migliorato la germinazione in semi di carota in condizioni di bassa temperatura (5°C).

#### **1.4.2 Idropriming**

Nell'idropriming come già accennato, i semi vengono imbibiti con sola acqua distillata per una durata variabile a seconda della specie e dell'esperimento. In letteratura ad esempio il trattamento di idropriming della durata di 6 ore per pomodoro, ravanella, cipolla, guar e semi di pisello ha portato a una migliore germinazione, ad un aumento del vigore della piantina, ad una maggiore formazione e mobilitazione delle riserve per la crescita delle piantine (Doijode et al., 1987) ed ha inoltre efficacemente ridotto il deterioramento fisiologico in melanzana e ravanelli (Rudrapal et al., 1988). Buoni risultati sono stati ottenuti con questa tecnica su Rosmarino. Ajorlou et al., (2011) hanno infatti riscontrato che il rosmarino trattato germina più velocemente e più uniformemente di semi non trattati; gli effetti dell'idropriming sono stati significativi sulla percentuale di germinazione e sul vigore delle plantule anche se non è stato significativo l'effetto sulla lunghezza delle

piantine ed sul loro peso secco. Il confronto tra le medie ha evidenziato che la più alta percentuale di germinazione e il più alto vigore delle piantine sono stati raggiunti con l'idropriming di 15 ore, e la maggiore lunghezza delle piantine ed il loro peso secco sono stati raggiunti con l'idropriming della durata di 10 ore. Su girasole il trattamento di idropriming per 24 ore è stato utile a migliorare la germinazione dei semi in condizioni normali e di stress. Sono aumentati infatti la percentuale di germinazione, la lunghezza della radice e del germoglio, il peso della radice e del germoglio rispetto al controllo (Moghanibashi et al., 2012). L'idropriming per 24 ore ha anche aumentato il vigore germinativo su Lupinella comune in confronto ad altri trattamenti quali quelli con soluzioni saline. (Noorbakhshian et al., 2011). In alcune varietà di colza sottoposte in laboratorio a stress idrico e salino, Aboutaleb et al. (2012) hanno riscontrato che il trattamento di idropriming ha migliorato la germinazione dei semi; si è verificato un aumento nella lunghezza della radichetta, nell'indice di germinazione e nell'indice di vigore. Gu et al. (2010) hanno evidenziato che su semi di tre cultivar triploidi di anguria l'idropriming ha notevolmente migliorato tasso di germinazione, l'energia germinativa e la lunghezza della radice rispetto al controllo. Su riso trattato con idropriming, il più elevato vigore germinativo è stato riscontrato nei semi trattati per 48 ore seguito da quelli trattati per 36 ore. (Farooq et al, 2006).

L'idropriming ha migliorato le prestazioni dei semi di *Agropyron elongatum* L. in condizioni di stress idrico e i miglioramenti più evidenti sono stati riscontrati ai livelli più alti di stress idrico (Abbasi et al., 2012). Su cumino l'idropriming ha migliorato sia il tasso di germinazione che il tempo medio di germinazione in

condizioni di stress salino. (Neamatollahi et al, 2009); Dursun et al (2010) hanno riscontrato che l'idropriming di 12, 24 e 36 ore su semi di prezzemolo ha apportato la più alta percentuale di germinazione rispetto ad altri trattamenti di priming effettuati.

### **1.4.3 Matric priming**

Il matric-priming prevede l'utilizzo di matrici organiche umide o materiale inorganico (Parera et al., 1994) che simulano i processi di imbibizione naturali che si verificano nel suolo (McDonald, 2000). La matrice deve possedere determinate caratteristiche:

- basso potenziale matriciale;
- elevata superficie specifica (cioè, elevato rapporto superficie /volume);
- trascurabile solubilità in acqua;
- elevata adesività alla superficie dei semi;
- elevata ritenzione idrica (Khan, 1991).

Diversi tipi di materiali possono essere efficacemente utilizzati per il priming con matrice solida, ma le ottimali condizioni di umidità e il tempo di trattamento devono essere determinati specificatamente per ogni matrice. I materiali generalmente utilizzati sono torba o vermiculite, e alcuni substrati commerciali come Celite ® o Micro-cel ®. Il seme è miscelato con il substrato che idrata gradualmente il seme (McDonald, 2000). Per migliorare il controllo dell' imbibizione del seme, l'acqua pura aggiunta al substrato può essere sostituita con una soluzione osmotica (Khan,

1991). Gli effetti del matrix priming sulla germinazione sono stati evidenziati in letteratura da Mereddy et al. (2000), i quali hanno evinto un maggiore vigore germinativo su okra attraverso il priming con matrice solida rispetto a semi non trattati; su semi di broccolo, in cui il trattamento ha diminuito il tempo medio di germinazione e aumentato il tasso di crescita delle radichette (Jett et al., 2002).

#### **1.4.4 Osmopriming**

Questa è la tecnica più comunemente usata. I semi sono immersi in una soluzione osmotica per consentirne l'imbibizione e l'attivazione metabolica, ma le condizioni osmotiche non consentono l'espansione cellulare. Gli agenti osmotici utilizzati sono mannitolo, Polietilenglicole (PEG) o sali come KCl e KNO<sub>3</sub>. Nell'osmopriming alcune soluzioni saline possono anche esercitare effetti nutrizionali diretti o indiretti, descritti da Dastur e Mone (1958), i quali osservarono che mentre le concentrazioni di azoto, potassio e fosfato negli embrioni di semi di cotone non sono cambiate dopo l'osmopriming, la concentrazione di alcuni micronutrienti (Manganese e Rame) è risultata aumentata.

Il PEG come agente osmotico, essendo inerte, può prevenire problemi di tossicità sull'embrione durante il priming (Cantliffe, 1983); può essere non tossico anche a concentrazioni di 500 grammi per litro (Hennart, 1985); infatti le grandi dimensioni della molecola PEG (p.m. da 6000 a 8000 ) impediscono la penetrazione nei tessuti del seme, evitando di abbassare il potenziale osmotico (Michel et al., 1973; Brocklehurst et al., 1984) . Le caratteristiche proprie del PEG ne hanno reso molto

frequente l'utilizzazione in laboratorio. Tuttavia le sue possibilità di impiego sono limitate, a causa del difficile processo di smaltimento e del rapporto tra costi e alte quantità richieste; infatti occorrono circa 300 g di PEG per litro di acqua per ottenere una pressione osmotica di -15 bar, a 15°C (Giulianini et al., 1992).

Molti esperimenti hanno mostrato che in semi trattati con PEG è aumentata la percentuale di germinazione, la percentuale di piantine normali, il Tempo Medio di Germinazione, la lunghezza e il peso secco della radice rispetto al controllo; anche su semi di soia sono stati riscontrati questi effetti positivi (Dehghani et al., 2011). Riguardo la maggiore tolleranza agli stress idrici, Rohui et al. (2011) hanno riscontrato che in semi di bromo inerme (*Bromus inermis*), festuca e gramigna, l'osmoprimering con PEG è stato un utile trattamento per aumentare la resistenza a stress salino rispetto all'idropriming; a riguardo, Jet et al. (1996) avevano precedentemente evidenziato che l'osmoprimering a confronto con l'idropriming, in caso di stress da siccità, può preservare la struttura della membrana plasmatica per cui i semi hanno risposte di germinazione migliori per un lungo periodo. L'osmoprimering con PEG si è rivelato anche un valido metodo per il miglioramento delle performance germinative sotto stress salino in frumento, come dimostrato da Basra et al. (2002), in cui il trattamento osmotico ha apportato una più rapida germinazione rispetto a frumento non trattato.

I sali inorganici determinano effetti variabili a seconda della specie. Ad esempio, l'osmoprimering con sali inorganici è risultato tossico in sorgo (Haigh et al., 1987), mentre era efficace in misura uguale al PEG in asparago (Pill, 1995) e in misura maggiore del PEG in pomodoro (Alvarado et al., 1988; Mauromicale et al., 1997).

Secondo Welbaum et al. (1998), la differenza nella risposta ai sali o al PEG tra le varie specie potrebbe essere dovuta alla presenza/assenza di uno strato semi-permeabile selettivo che circonda l'embrione: quando questo strato è presente permette l'assorbimento di acqua ma impedisce la diffusione del sale; quando è assente, gli ioni possono essere assorbiti e causare danni all'embrione). Ad esempio, i semi di pomodoro, melone, lattuga e peperone possiedono questo strato e possono essere sottoposti a osmoprimering con sali inorganici (Welbaum et al., 1990; Taylor et al., 1997). Al contrario, questo trattamento è risultato dannoso per semi di broccolo e cavolo, che non presentano questo strato (Taylor et al., 1997).

Christiansen et al. (1979) e Hecht (1979) hanno riscontrato una maggiore germinabilità nei semi trattati con soluzione osmotica di sali di Calcio: la concentrazione del sale e la percentuale di germinazione erano positivamente correlate spiegando il ruolo positivo del calcio come componente importante della stabilizzazione della membrana e come cofattore enzimatico.

Ramalal et al. (1993) hanno riportato che il priming di mais con una soluzione di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ha significativamente aumentato la germinazione, la velocità di emergenza, la lunghezza delle radichette, l'indice vigore e il peso secco delle piantine rispetto al controllo. Kurdikeri et al. (1993), hanno riportato che in semi di mais di 12 mesi si è avuta una più alta germinabilità con l'imbibizione in soluzione di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  all'1%; anche l'indice di vigore e il tasso di crescita sono risultati elevati. Similarmente Paul et al. (1991) hanno riportato che il priming di semi di frumento con soluzione all'1% di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  per 12 ore ha incrementato la germinazione e il vigore germinativo. Lo stesso agente osmotico al 10% di concentrazione ha incrementato germinabilità,



vigore germinativo e lunghezza delle radici di semi di arachidi (Rangaswamy et al., 1993).

Il sale inorganico più comunemente utilizzato risulta essere il  $\text{KNO}_3$ , che in grano tenero e colza ha aumentato il tasso di germinazione rispetto agli altri trattamenti di priming (Ajirloo et al 2013; Saber et al., 2012). L'osmopriming con  $\text{KNO}_3$  effettuato su girasole ha migliorato la tolleranza allo stress salino (Farhoudi et al, 2012) e ha migliorato il vigore germinativo e lo sviluppo delle piantine (Singh et al,) così come in pisello (Okcu et al, 2005) e melone (Demir et al., 1999). L'osmopriming con  $\text{KNO}_3$  è risultato efficace anche nel miglioramento della germinazione e della emergenza anticipata delle piantine di lattuga (Chen, et al. 2010), e una più rapida ed uniforme emergenza su semi di melone (Farooq et al, 2007). Khoshvaghti et al. (2013) hanno recentemente riscontrato che tra i vari trattamenti effettuati su aneto, il  $\text{KNO}_3$  ha dato i migliori risultati sulla percentuale di germinazione (84%) e sullo sviluppo delle piantine e anche sul contenuto in olio essenziale.

Il priming con soluzione osmotica comporta un controllo nell'assorbimento di acqua, attraverso la regolazione del potenziale osmotico ( $\psi$ ) (Taylor et al., 1998). Il potenziale di una soluzione osmotica con sali inorganici può essere calcolato secondo l'equazione di van't Hoff (Salisbury et al., 1985) :

$$\psi = - i m R T$$

dove  $i$  è il coefficiente di van't Hoff (adimensionale),  $m$  rappresenta la molalità,  $R$  la costante dei gas e  $T$  la temperatura assoluta (in Kelvin) . Il potenziale osmotico  $\psi$  in semi ortodossi secchi è molto basso (tra -350 e -50 MPa) (Roberts et al., 1989) e il

tasso di assorbimento idrico risulta elevato quando il  $\psi$  ambientale è compreso tra 0 e -2 e MPa (Bradford, 1995). Ridurre il potenziale ambientale attraverso le soluzioni osmotiche rallenta l'assorbimento di acqua ed estende la durata della fase II del processo germinativo, evitando la comparsa della radichetta, come mostrato in figura 2, e risulta appunto l'obiettivo delle tecniche di priming (Bray, 1995).

Il potenziale osmotico della soluzione è un importante fattore che influenza la durata e l'efficacia del priming. Un lieve cambiamento nel potenziale osmotico della soluzione può far variare l'efficacia del trattamento di osmoprimering, (Parera et al., 1994) a seconda della specie. In semi di pomodoro la germinazione è avvenuta più rapidamente quando il potenziale osmotico della soluzione era di -0,58 o -0,86 in confronto a valori di -1,19 o -1,49 MPa; questi range osmotici invece non hanno dato risultati diversi tra loro in cipolla; un più alto tasso di germinazione è stato riscontrato in semi di sedano ad una concentrazione di PEG 6000 di 300 g per litro rispetto ad una concentrazione più alta, di 400 g/litro (Signh et al., 1985).

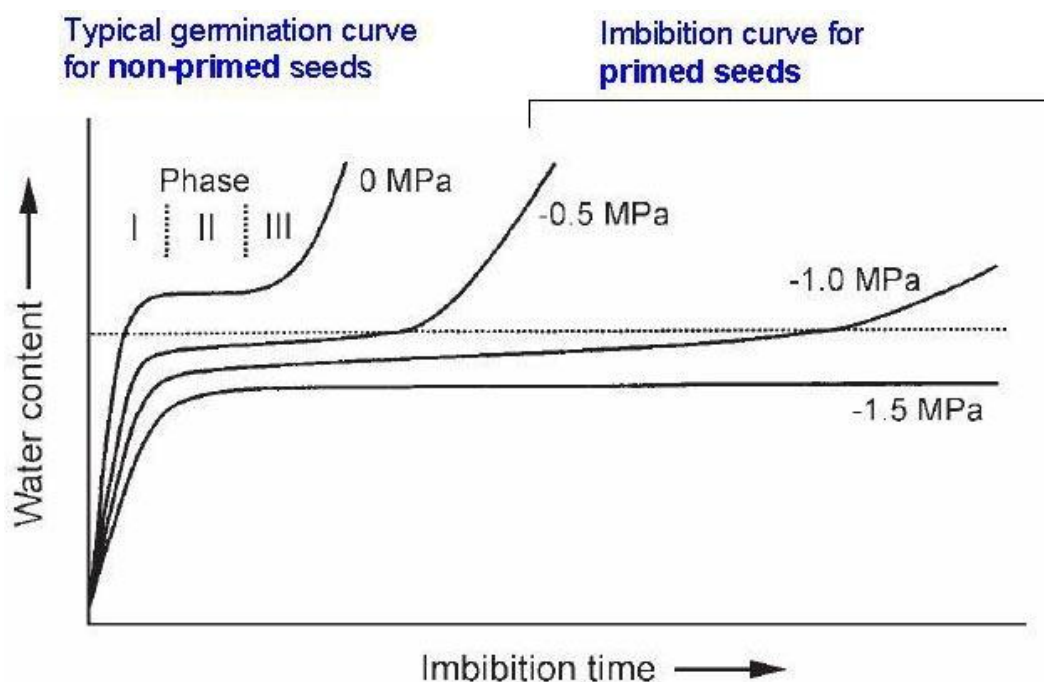


Figura 2: assorbimento di acqua durante il processo germinativo di semi non trattati e di semi sottoposti a priming. (<http://www.hort.iastate.edu/research/chen>)

La tecnica dell' osmopriming è influenzata da molti fattori (aerazione, luce, temperatura, qualità delle sementi). L'aerazione, specialmente in una soluzione di PEG in cui la elevata viscosità della molecola riduce la concentrazione di ossigeno nella soluzione, è considerata importante per la respirazione dei semi (Bujalski et al., 1989; Bujalski et al., 1991) che è essenziale per la vitalità sementi e contribuisce a sincronizzare l'emergenza (Heydecker et al., 1975). Aerare la soluzione durante l'osmopriming con PEG può superare questo problema (Akers, 1990; Bujalski et al., 1991). L'effetto di aerazione varia comunque a seconda della specie: in cipolla, l'aerazione della soluzione con PEG ha aumentato la percentuale di germinazione, rispetto al trattamento non-aerato (Heydecker et al., 1977; Bujalski et al, 1989); al

contrario, nessuna differenza è stata osservata nella germinazione di lattuga tra soluzione aerata e non aerata con  $K_3PO_4$  (Cantliffe, 1981). Nella maggior parte dei casi esaminati, il priming con aerazione è preferibile, in quanto garantisce un microambiente più sicuro per il seme.

Per quanto concerne il fattore luce, semi fotoblastici come lattuga e sedano, che necessitano di luce per la germinazione, possono essere trattati con priming in ambiente illuminato per ridurre la dormienza (Khan et al., 1978), anche se è stato riscontrato che migliori risultati in lattuga sono stati ottenuti con priming in assenza di luce (Cantliffe et al., 1981)

In un esperimento su otto diverse cultivar di tabacco, Mukarati et al. (2013) hanno riscontrato che l'osmopriming effettuato a temperature elevate ( $33 \pm 2^\circ C$ ) in assenza di luce ha dato percentuali di germinazione più basse rispetto a quando imbibite con luce a  $20-30^\circ C$ .

La temperatura è un'altra variabile importante, in quanto influisce sulla velocità delle reazioni chimiche e sul valore di  $\psi$ . Nella maggior parte delle specie esaminate in letteratura, la temperatura di  $15^\circ C$  durante il priming ha dato i migliori risultati (Bradford, 1986) mentre temperature più basse hanno rallentato i processi di germinazione, richiedendo tempi più lunghi per raggiungere gli stessi risultati (McDonald, 2000). L'intervallo di temperatura normalmente utilizzato nel priming varia tra i  $15$  e i  $20^\circ C$ .

Dursum et al. (2011) tuttavia, effettuando vari trattamenti di priming su prezzemolo, hanno riscontrato che l'aumento della percentuale di germinazione si è avuto sia ad alte che a basse temperature (5,10,15,20,25°C).

Riguardo la qualità del seme, numerosi autori (Bradford et al, 1990; Haigh et al, 1987, Heydecker et al., 1977) hanno riscontrato una diversa risposta al trattamento di priming tra diversi lotti di seme della stessa specie. Perkins et al (1984) hanno dimostrato che il vigore del seme è un altro fattore che influenza la risposta al priming. Hanno riportato che il priming non ha diminuito la termodormienza in semi di due cultivar di lattuga (Great Lakes e Montello) invecchiati artificialmente, ma ha avuto effetto sui semi non invecchiati. Dearman et al (1986), in un esperimento su cipolla, hanno concluso che la perdita di vitalità durante l'invecchiamento artificiale dei semi non potrebbe essere recuperato attraverso il priming. Quei semi, tuttavia, che erano ancora vitali dopo l'invecchiamento, dopo il priming hanno migliorato il tasso di germinazione. El Balla (1987) ha raccomandato l'uso di semi di carota di alta qualità per ottenere i migliori risultati dal priming.

Powell et al. (2000) suggeriscono che i semi con scarso vigore possono beneficiare del priming, mentre nei semi trattati di elevato vigore vi è un rapido avanzamento della germinazione che progredisce verso una fase in cui i semi diventano suscettibili ad un più rapido deterioramento nel successivo stoccaggio .

Un altro aspetto fondamentale è la maturità seme. In melone i semi raccolti ancora non totalmente maturi, 40 giorni dopo l'antesi, erano più ricettivi all'osmopriming rispetto ai semi raccolti 60 giorni dopo la fioritura (Welbaum et al., 1991). Dal

momento che i semi sono stati trattati subito dopo la raccolta, è ipotizzabile che l'osmopriming abbia attivato i processi fisiologici che abbiano contribuito al completamento della maturazione dei semi raccolti a 40 giorni dalla fioritura, quindi non completamente maturi. Questi risultati suggeriscono che il priming potrebbe essere utile ad uniformare lotti di seme raccolti ad un grado di maturità non uniforme tra loro. Jett e Welbaum (1996) hanno infatti riscontrato che il trattamento migliora anche il vigore dei semi di broccolo non ancora maturi.

## **CAPITOLO 2**

### **2.1 Scopo della tesi**

I trattamenti pregerminativi del seme sono stati affrontati in campo nazionale ed internazionale soprattutto negli anni '80, quando sia le ditte sementiere che la sperimentazione, affrontarono questo problema con ricerche molte volte valide ma, anche, spesso dettate da necessità di mettere in commercio prodotti stimolanti la germinazione a caro prezzo ma di dubbia efficacia.

Il numero delle industrie sementiere sia nazionali che internazionali nell'ultimo ventennio è notevolmente diminuito ed ormai la grande commercializzazione del seme è in mano a poche multinazionali che hanno preferito rivolgere la ricerca sulla costituzione di varietà o ibridi rispondenti alle esigenze del mercato che non alla tecnologia sementiera.

Il presente lavoro ha voluto soffermarsi su alcuni aspetti inerenti proprio la tecnologia sementiera atti ad esaltare le caratteristiche germinative di alcune specie aromatiche di largo impiego. Accorciare la fase dell'emergenza significa esporre la piante in misura minore ad influenze negative biotiche ed abiotiche ed avere anche una maggiore uniformità nelle prime fasi di crescita, cosa che permette un miglior controllo delle infestanti ed una produzione più uniforme e qualitativamente migliore.

Quando poi, per ragioni di vivaismo, si opera in ambiente protetto, completare il ciclo di produzione delle piantine in termini più brevi da anche la possibilità di risparmiare sull'energia che, in generale, serve a compiere un ciclo produttivo. E' evidente che tutti

i trattamenti effettuati non devono e non possono tendere ad innalzare le caratteristiche di germinabilità di un singolo lotto di seme, cosa che non è perseguibile se non eliminando eventuali fenomeni di dormienza.

Quello che si è cercato di evidenziare è un miglioramento delle caratteristiche qualitative per quanto riguarda la velocità del processo di germinazione.



## CAPITOLO 3

### 3.1 Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta tra il mese di Ottobre 2012 e il Marzo del 2013 presso il “Laboratorio di Ricerca ed Analisi delle Sementi” (LARAS) del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali (DiSAAA-a) dell’ Università di Pisa.

Al fine di saggiare la germinabilità ed il Tempo Medio di Germinazione in ambiente controllato di laboratorio, sono state impiegate le seguenti specie aromatiche: *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman, *Anethum graveolens* L., *Origanum majorana* L. e *Allium schoenoprasum* L.; i campioni di seme utilizzato sono stati forniti da un vivaista locale e provenivano da ditte commerciali italiane.

Le tesi poste a confronto per ciascuna specie sono state eseguite secondo diverse modalità. Ogni tesi era costituita da quattro repliche di 100 semi. Riguardo alle varie metodologie adottate, alle temperature e alla durata delle prove di germinazione, sono stati presi come riferimento le norme I.S.T.A. (International Seed Testing Association, 2005).

Le prove sono state effettuate utilizzando capsule Petri di 15 cm di diametro eccetto per maggiorana per la quale sono state utilizzate capsule da 9 cm di diametro, all’interno delle quali i semi venivano posti a germinare su carta da filtro alla quale veniva aggiunta acqua distillata durante la sperimentazione per mantenere le condizioni di umidità adeguate al processo di germinazione.

Al fine di evitare perdite di umidità, le capsule sono state avvolte in buste di polietilene trasparente e poste in armadi climatici provvisti di termo e foto-regolazione. L'illuminazione è stata fornita da lampade a luce bianca fredda (Osram 18w/20, 50  $\mu\text{mol}$  di fotoni  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  come Photosynthetic Active Radiation).

### ***Testimone***

Per *Petroselinum crispum*, *Antheum graveolens* e *Origanum majorana* i test sono stati effettuati ad una temperatura alternata di 20°C per 16 h in presenza di luce e 30°C per 8 h in assenza di luce; per *Allium schoenoprasum* il test è stato realizzato alla temperatura costante di 20°C.

Nel caso di *Anethum graveolens* e *Allium schoenoprasum*, i semi sono stati precedentemente pre-refrigerati alla temperatura di 4°C per quattro giorni.

I risultati ottenuti da queste prime indagini sono stati considerati come testimoni per le successive analisi.

Bisogna dire che per le prove di germinazione dei campioni di testimone di *Allium schoenoprasum* si è avuta un'immediata e uniforme germinazione per cui non si è ritenuto necessario il proseguimento delle prove di priming per questa specie.

### **3.1.1 Trattamenti di priming**

#### ***Idropriming***

Per l'esecuzione del trattamento di idropriming i campioni di seme delle varie specie sono stati posti ad imbibire con acqua distillata a 20°C: la durata del trattamento e le quantità di acqua sono variate in base alla specie: per maggiorana e aneto la durata dell'idropriming è stata di 5 giorni, per prezzemolo 7 giorni, con una quantità di acqua rispettivamente di 9 ml per maggiorana e 15 ml per aneto e prezzemolo per ogni capsula contenente 100 semi. I semi sono stati posti ad imbibire in capsula Petri con carta da filtro soprastante e sottostante i semi, per favorire il contatto del seme con l'acqua. Dopodiché i semi sono stati subito messi a germinare.

#### ***Trattamento osmotico con soluzione di $KNO_3$***

Per l'imbibizione sono stati preparati due tipi soluzioni, al 2% e 4% di  $KNO_3$ , sciogliendo rispettivamente 2 e 4 grammi di sale in 1 litro di acqua deionizzata. Si è scelto di effettuare tre trattamenti per ciascuna soluzione che differivano in base alla durata: 4, 8 e 12 giorni. Per ciascuna specie sono stati contati 400 semi posti poi a imbibire direttamente in una capsula Petri ricoperti con tale soluzione. Le capsule sono state lasciate in armadio termoclimatico, alla temperatura costante di 15°C per la durata prevista per ogni trattamento, giornalmente, agitate per evitare eventuali carenze di ossigeno.

Trascorso questo periodo, i semi sono stati sciacquati sotto acqua corrente per 3 minuti, posti in frigo ad asciugare per un massimo di 24 h fino a quando non risultavano asciutti e lasciati ad essiccare per 2 giorni in armadio termoclimatico a 30 °C prima di essere posti a germinare.

### ***Trattamento osmotico con soluzione di PEG***

Per i nostri trattamenti è stato impiegato il Polietileneglicole 6000 [HO(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>H] ad una pressione osmotica di 13 bar. Anche in questo caso si è scelto di verificare gli effetti di una diversa durata del trattamento, ovvero di 4, 8 e 12 giorni.

Per l'imbibizione dei semi, si è proceduto come nel caso del trattamento osmotico con KNO<sub>3</sub>, ponendo 100 semi per ogni capsula Petri per ciascuna specie. Le capsule sono state lasciate in armadio termoclimatico, alla temperatura costante di 15°C, per periodi di tempo diversi in base alla durata prevista per il trattamento, e giornalmente agitate per evitare eventuali carenze di ossigeno.

Alla fine di ogni trattamento, come nel trattamento con KNO<sub>3</sub> i semi sono stati sciacquati sotto acqua corrente per 3 minuti, posti in frigo ad asciugare e successivamente lasciati ad essiccare per 2 giorni in armadio termoclimatico alla temperatura di 30°C. Trascorso questo periodo, i semi sono stati posti a germinare.

La durata delle prove di germinazione è stata di 21 giorni per aneto e maggiorana e 28 giorni per prezzemolo. Durante questi periodi, a giorni alterni, si è operata la

conta dei semi germinati, considerando germinato quel seme che aveva emesso la radichetta di lunghezza superiore od uguale alla dimensione del seme stesso.

Utilizzando i risultati ottenuti, si è andati quindi a calcolare la germinabilità dei semi (Hartmann e Kester, 1990) e l'Energia germinativa espressa come Tempo Medio di Germinazione (T.M.G.) secondo la formula di Ellis e Roberts, 1981.

$$\text{T.M.G.} = \Sigma(n \times g)/N$$

**n** = numero di semi nati per ciascun giorno,

**g** = numero di giorni impiegati a germinare,

**N** = numero complessivo dei semi germinati.

I due parametri, percentuale di germinazione ed energia germinativa, sono stati misurati aderendo alle indicazioni dell'International Rules for Seed Testing (2005) e ai Metodi Ufficiali di Analisi per le Sementi (1992).

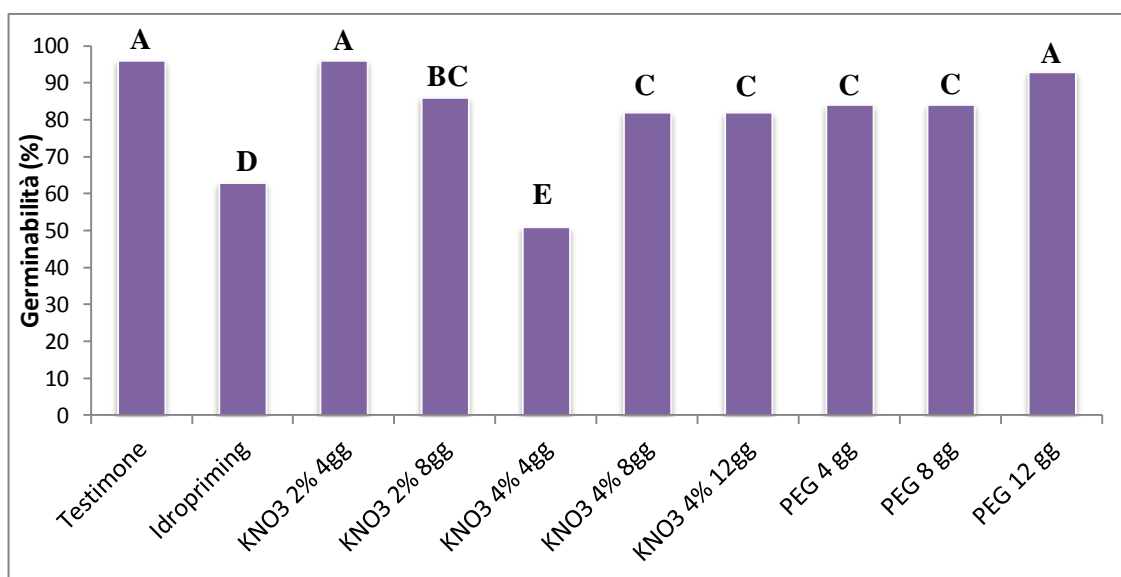
### **3.1.2 Analisi statistica**

I dati ottenuti dalla sperimentazione sono stati sottoposti all'analisi della varianza, previa trasformazione dei valori percentuali in valori angolari secondo la formula di BLISS (Bliss, 1937). I vari parametri sono stati elaborati secondo due schemi sperimentali: schema blocco randomizzato e schema fattoriale AxB (Gomez, 1984).

## 3.2 Risultati e discussione

### *Aneto*

In questa specie la massima percentuale di germinazione è stata raggiunta dal testimone e dai semi trattati con  $\text{KNO}_3$  al 2% per 4 giorni. Gli altri trattamenti hanno anch'essi dato percentuali di germinazione simili, tranne l'idropriming e il trattamento osmotico con  $\text{KNO}_3$  di 4 giorni al 4%.



Per ciascun parametro analizzato, i valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P \leq 0,01$ .

**Grafico 1:** effetto dei vari trattamenti sulla percentuale di germinazione.

In aneto è stata evidenziata una più alta energia germinativa nelle tesi trattate con  $\text{KNO}_3$  per 8 giorni sia al 2% che al 4% di concentrazione; infatti il processo

germinativo si è concluso in meno di quattro giorni. Il testimone e i campioni di seme sottoposti ad idropriming hanno compiuto il processo germinativo in più di 7 giorni.

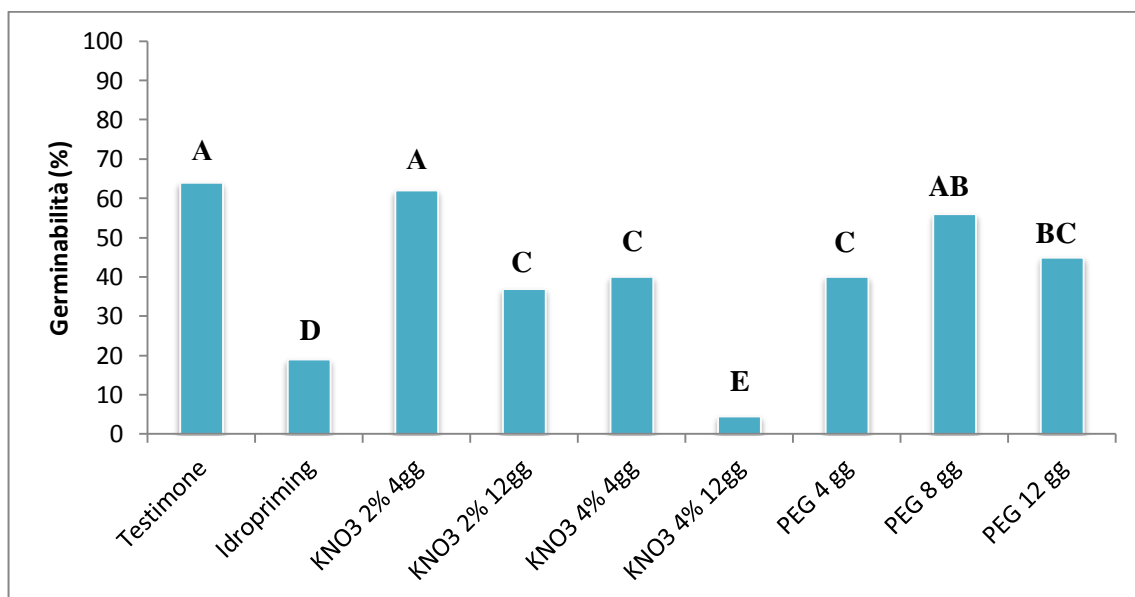
TRATTAMENTI	TMG (gg)
<b>Testimone</b>	<b>7,13 A</b>
<b>Idropriming</b>	<b>7,46 A</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 2% 4gg</b>	<b>5,8 B</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 2% 8gg</b>	<b>3 E</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 4gg</b>	<b>6,87 A</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 8gg</b>	<b>3,4 E</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 12gg</b>	<b>4 DE</b>
<b>PEG 4 gg</b>	<b>5,96 B</b>
<b>PEG 8 gg</b>	<b>4,8 C</b>
<b>PEG 12 gg</b>	<b>4,76 C</b>

*Per ciascun parametro analizzato, i valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P \leq 0,01$ .*

**Tabella 1. Effetto dell'impiego di alcuni trattamenti sul Tempo Medio di Germinazione (TMG).**

### **Maggiorana**

Come evidenziato nel grafico n.2 i risultati ottenuti dalle prove di priming evidenziano la germinabilità più elevata nel testimone; valori percentuali vicini a quelli del testimone sono stati ottenuti attraverso il trattamento con soluzione di KNO<sub>3</sub> al 2% della durata di 4 giorni e con il PEG per 8 giorni. E' da notare che il trattamento con KNO<sub>3</sub> al 4% per 12 giorni ha apportato una percentuale di germinazione notevolmente bassa (4,5%).



*Per ciascun parametro analizzato, i valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P \leq 0,01$ .*

***Grafico 2: effetto dei vari trattamenti sulla percentuale di germinazione.***

In maggioranza il minore tempo medio di germinazione (circa 6 giorni) è stato riscontrato nei semi sottoposti ai trattamenti con PEG e KNO<sub>3</sub> al 2% di 12 giorni; seguito da un tempo di germinazione di 7,05 giorni con KNO<sub>3</sub> al 2% per 4 giorni. L'idropriming ha apportato un allungamento del tempo medio di germinazione maggiore di 4 giorni rispetto al testimone.



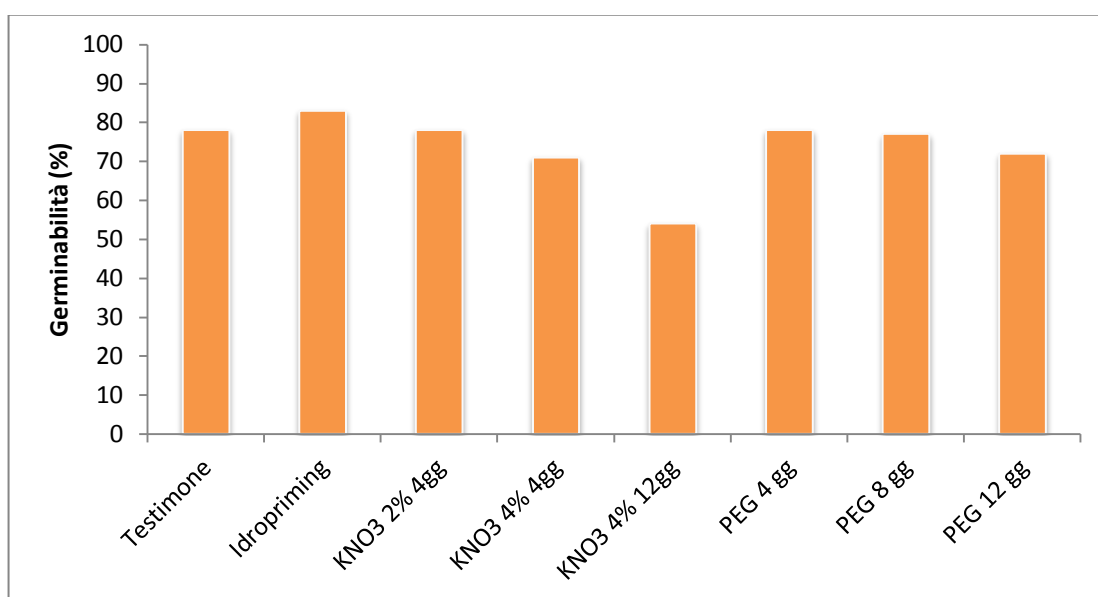
TRATTAMENTI	TMG (gg)
Testimone	7,95 BC
Idropriming	11,55 A
KNO <sub>3</sub> 2% 4gg	7,05 CD
KNO <sub>3</sub> 2% 12gg	5,45 D
KNO <sub>3</sub> 4% 4gg	7,15 BCD
KNO <sub>3</sub> 4% 12gg	9,55 AB
PEG 4 gg	8,75 BC
PEG 8 gg	8,65 BC
PEG 12 gg	5,4 D

*Per ciascun parametro analizzato, i valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .*

***Tabella 2. Effetto dell'impiego di alcuni trattamenti sul tempo medio di germinazione (TMG)***

### ***Prezzemolo***

Secondo quanto riportato nel grafico n.3, la più alta percentuale di germinazione in questa specie, è stata indotta dal trattamento di idropriming (83%), seguita da una germinabilità del 78% con i trattamenti PEG e KNO<sub>3</sub> al 2% entrambi per 4 giorni, e con il testimone. Gli altri trattamenti hanno comunque apportato valori simili, tra il 71 e il 77%, eccetto il trattamento con KNO<sub>3</sub> al 4% per 12 giorni (54%).



***Grafico 3: effetto dei vari trattamenti sulla percentuale di germinazione.***

In prezzemolo sia il testimone che i campioni di semi sottoposti ad idropriming hanno mostrato i tempi più lunghi di germinazione (quasi 20 giorni), mentre il valore temporale più basso si è ottenuto con il trattamento con KNO<sub>3</sub> alla più alta concentrazione per 12 giorni.

TRATTAMENTI	TMG (gg)
<b>Testimone</b>	<b>19,35 A</b>
<b>Idropriming</b>	<b>19,4 A</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 2% 4gg</b>	<b>10,75 C</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 4gg</b>	<b>10,55 C</b>
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 12gg</b>	<b>9,95 C</b>
<b>PEG 4 gg</b>	<b>16,7 AB</b>
<b>PEG 8 gg</b>	<b>15 B</b>
<b>PEG 12 gg</b>	<b>16,2 B</b>

*Per ciascun parametro analizzato, i valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .*

***Tabella 3. Effetto dell'impiego di alcuni trattamenti sul tempo medio di germinazione (TMG)***

### **3.2.1 Analisi dell'interazione specie x trattamento**

Dall'analisi dell'interazione è stato evidenziato come l'aneto sia la specie che reagisce meglio ai trattamenti imposti mantenendo generalmente alte germinabilità. La maggiorana al contrario mostra in alcuni trattamenti decrementi di germinabilità notevoli. Il prezzemolo ha un comportamento simile all'aneto con diminuzione della germinabilità notevoli nel caso del trattamento con KNO<sub>3</sub> al 4% per 12 giorni.

Tesi	Maggiorana	Prezzemolo	Aneto
<b>Testimone</b>	64 EFG	78 CDE	96 A
<b>Idropriming</b>	19 I	83 ABCD	63 EFG
<b>KNO<sub>3</sub> 2% 4 gg</b>	62 EFG	78 CDE	96 A
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 4 gg</b>	40 H	71 EF	51 GH
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 12 gg</b>	4,5 L	54 FGH	82 BCD
<b>PEG 4 gg</b>	40 H	78 CDE	84 BCD
<b>PEG 8 gg</b>	56 FGH	77 CDE	84 BCD
<b>PEG 12gg</b>	45 GH	72 DEF	93 AB

*I valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .*

***Tabella 4: Effetto dell'interazione tra le specie ed i trattamenti utilizzati sulla germinabilità (%).***

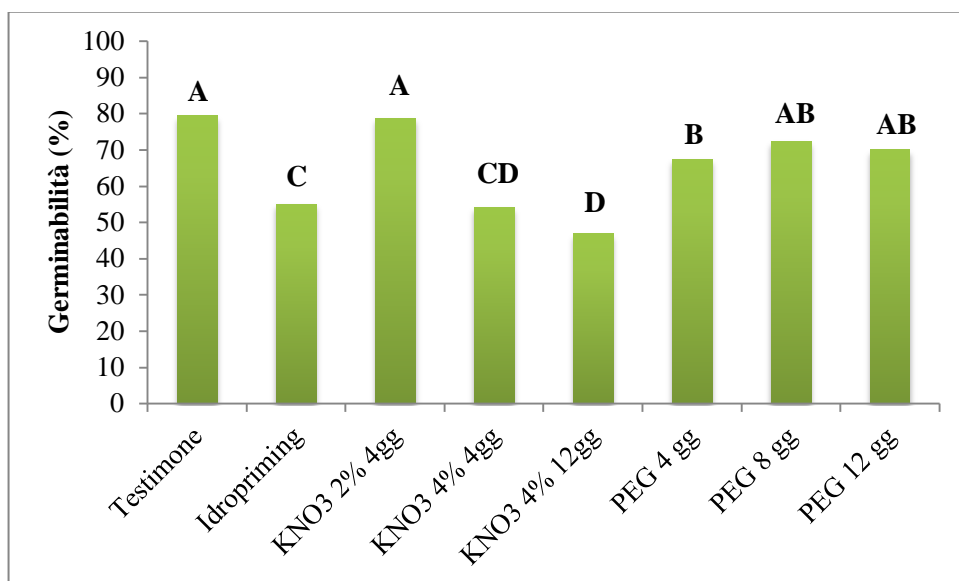
Il Tempo Medio di Germinazione, la diminuzione del quale è lo scopo principale dei vari trattamenti effettuati, mostra differenze statisticamente significative in ordine sia alle specie esaminate che al tipo di trattamento utilizzato. Il trattamento con PEG per 12 giorni riduce significativamente il tempo medio di germinazione in maggiorana ed aneto; nel prezzemolo invece, specie caratterizzata da tempi di germinazione abbastanza lunghi, è l'impiego del KNO<sub>3</sub> al 4% per 12 giorni che riduce la fase germinativa di quasi 9 giorni rispetto al testimone. Da notare come in queste tre specie esaminate l'idropriming non comporti alcuna riduzione della durata del TMG: nel prezzemolo e nell'aneto non emerge alcuna differenza statisticamente significativa del trattamento con il testimone, mentre nella maggiorana addirittura l'impiego dell'idropriming causa un aumento del valore del tempo medio di germinazione rispetto al testimone.

Tesi	Maggiorana	Prezzemolo	Aneto
<b>Testimone</b>	7.95 EFG	19.35 A	7.4 FGH
<b>Idropriming</b>	11.55 C	19.4 A	7.2 FGH
<b>KNO<sub>3</sub> 2% 4 gg</b>	7.05 FGH	10.75 CD	5.72 HIL
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 4 gg</b>	7.15 FGH	10.55 CD	6.51 GHI
<b>KNO<sub>3</sub> 4% 12 gg</b>	9.55 CDE	9.95 CDE	4 L
<b>PEG 4 gg</b>	8.75 DEF	16.7 B	5.8 HIL
<b>PEG 8 gg</b>	8.65 DEF	15 B	4.7 IL
<b>PEG 12gg</b>	5.4 HIL	16.2 B	4.7 IL

*I valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .*

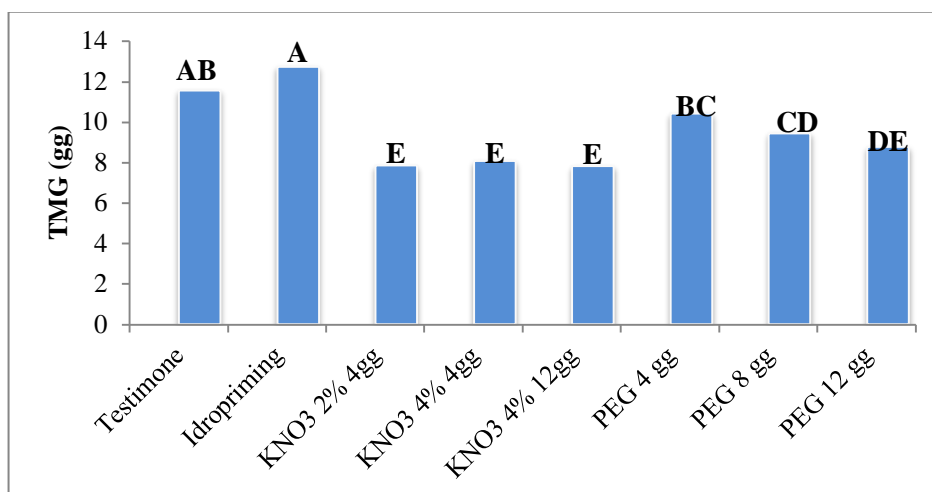
***Tabella 5: Effetto dell'interazione tra le specie ed i trattamenti utilizzati sul Tempo Medio di Germinazione (giorni).***

Come evidenziato nel grafico n.4, il più elevato numero di semi germinati si è avuto con i campioni di seme di testimone. Tra i trattamenti effettuati quello che ha fornito il valore di germinabilità significativamente più elevato è stato il priming con KNO<sub>3</sub> al 2% di concentrazione della durata di 4 giorni, con un valore medio di germinabilità del 79%, seguito dal trattamento con PEG di 8 giorni.



*I valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .* **Grafico 4:**  
**Valori medi di germinabilità dei trattamenti impiegati nelle specie esaminate.**

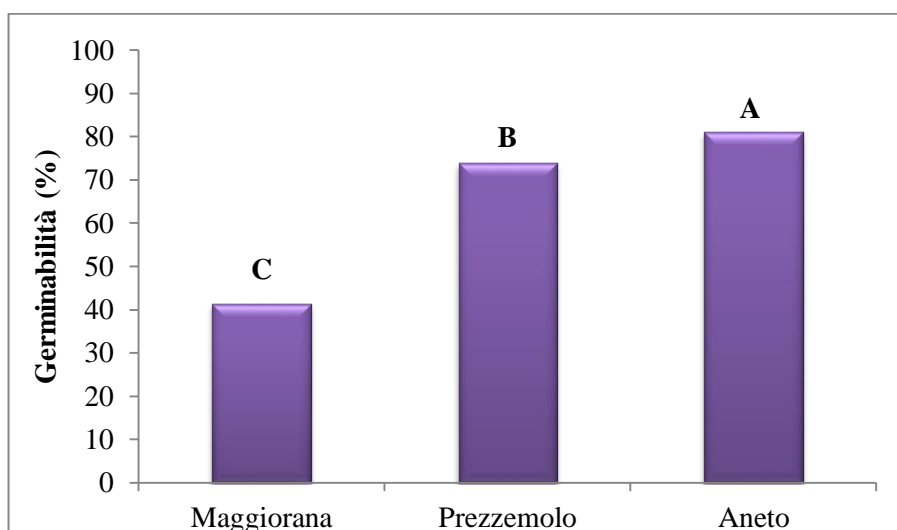
Nel caso del TMG, tra i vari trattamenti effettuati quello con KNO<sub>3</sub> al 2% della durata di 4 giorni e il trattamento con KNO<sub>3</sub> al 4% della durata di 12 giorni hanno apportato in generale il tempo medio di germinazione più basso, come mostrato nel grafico n.5.



*I valori contrassegnati da lettere uguali non sono significativamente diversi tra loro per  $P < 0,01$ .*

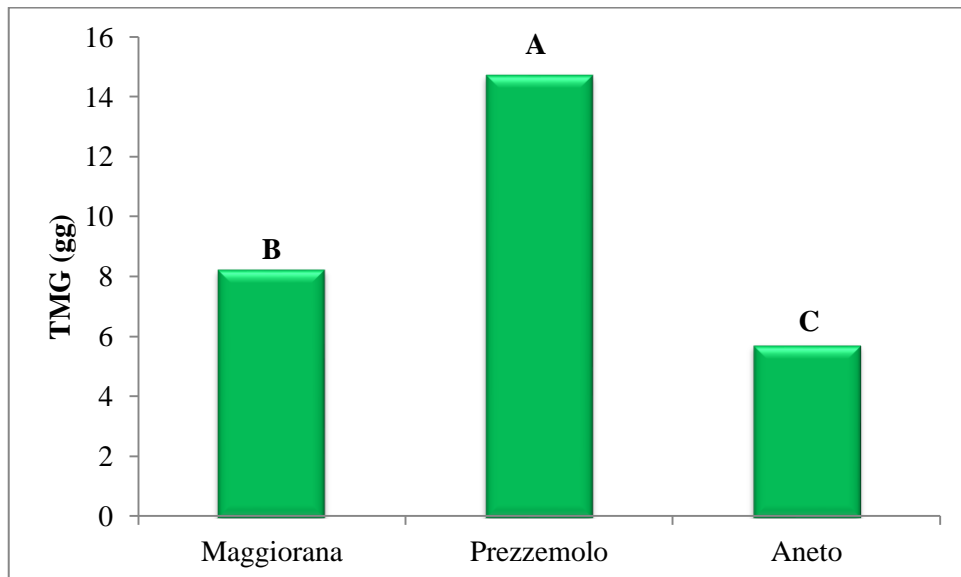
**Grafico 5: TMG dei trattamenti impiegati nelle specie esaminate.**

I valori medi di germinabilità calcolati per specie rilevano evidenziano che l'aneto presenta la germinabilità media più alta (81%); a seguire il prezzemolo con una percentuale media del 78%, e la maggiorana con il 41%.



**Grafico 6: Valori medi di germinabilità alle varie tesi saggate delle diverse specie in esame.**

L'aneto mostra anche l'Energia Germinativa più alta, portando a termine la fase di germinazione in meno di 6 giorni; il prezzemolo presenta un TMG alto, di quasi 15 giorni, mentre per la maggiorana osserviamo un tempo medio di germinazione di 8 giorni.



***Grafico 7: Valori TMG alle varie tesi saggate delle diverse specie in esame.***



## **CAPITOLO 4**

### **4.1 Considerazioni conclusive**

Il settore sementiero soprattutto in Italia attraverso un momento di stasi per quanto riguarda la tecnologia. Nel campo della scelta varietale ormai ci si rivolge alle multinazionali che detengono la quasi totalità del mercato offrendo prodotti a valenza globale e non considerando le esigenze e le caratteristiche dei singoli mercati nazionali. Esiste inoltre un piccolo segmento della commercializzazione che interessa ancora le vecchie varietà locali ma è soltanto a livello amatoriale o relegato a piccole aree per una determinata commercializzazione in un mercato particolare e molto ristretto. La tecnologia sementiera che pur negli anni '80 rivestiva grande interesse da parte delle ditte del settore è oggi studiata e applicata da poche industrie specializzate. Nei cataloghi anche delle ditte sementiere italiane troviamo semi confettati, semi trattati in diversa maniera per la sincronizzazione della germinazione e semi selezionati per mantenere le percentuali di germinazione a livelli molto alti soprattutto per quanto attiene il settore orticolo e floricolo.

I trattamenti al seme per migliorare le caratteristiche germinative come il tempo medio di germinazione sono stati oggetto di numerosi studi come la bibliografia evidenzia. Molti di questi studi sono stati rivolti a specie di pieno campo dove ferma restando l'importanza di una germinazione veloce ed omogenea rimane insormontabile il problema dei costi necessari per il trattamento.

I trattamenti di priming ed osmopriming oggi devono essere rivolti esclusivamente a semi di alto valore commerciale per ammortizzare le spese necessarie per il

trattamento stesso. La moderna agricoltura oggi si avvale di sementi che hanno un prezzo (imposto sempre dalle multinazionali) molto alto e che può sopportare un valore aggiunto determinato dal trattamento stesso. Il problema principale, come evidenziato anche da precedenti sperimentazioni e da quanto esposto nella presente tesi, è che non si può standardizzare i singoli trattamenti per ogni singola specie. Ogni lotto di seme nell'ambito della specie reagisce in modo diverso; questo fa sì che per una minima standardizzazione bisogna crearsi una banca dati basata su esperienze acquisite ed una sperimentazione capillare su moltissimi lotti di seme. Forse si potrebbe proporre di usare priming e osmopriming più che all'industria sementiera al singolo vivaista naturalmente dotato di attrezzature e di conoscenze tecnologiche adeguate. Con un po' di esperienza potrebbe raggiungere risultati interessanti per la sua azienda, risultati che porterebbero ad una diminuzione dei tempi medi di germinazione e quindi ad un parallelo diminuire del tempo necessario per la produzione di piantine in serra con indubbio risparmio di energia e di tempi.

## BIBLIOGRAFIA

Ajirloo A., Shaban, Moghanloo, Ahmadi, 2013; Effect of priming on seed germination characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) Intl J Agri Crop Sci. Vol., 5 (15), 1670-1674.

Ajorlou M., 2011. Hydropriming influence on seedling vigour in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) J. Fish & Hydrobiol., 6(4): 491-494.

Alvarado AD, Bradford KJ, 1988. Priming and storage of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. I. Effects of storage temperature on germination rate and viability. Seed Sci. Technol. 16:601-612.

Ashraf M., Bray C.M., 1993. DNA synthesis in osmoprimed leek (*Allium porrum* L.) seed. Seed Sci. Res. 3:15-23.

Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D, 1998. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. Physiol. Plant. 104:646-652.

Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D, 2000. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. *Seed Sci. Res.* 10:35-42.

Bartolo ME, Carter JV, 1991. Microtubules in the mesophyll cells of nonacclimated and cold-acclimated spinach. *Plant Physiol.* 97:175-181.

Basra S.M.A., Afzal I., Anwar S., Shafique M., Haq A., Majeed K. (2005): Effect of different seed invigoration techniques on wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds sown under saline and non-saline conditions. *J. Seed Technol.*, 28: 36–45.

Basu, R. N., 1994. An appraisal of research on wet and dry physiological seed treatments and their applicability with special reference to tropical and sub-tropical countries. *Seed Sci & Technol*, 22: 107–126.

Bewley, J.D., Black, M., 1978, Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annu Rev Plant Physio*, 30: 195-238.

Braccini, A.L., Reis, M.S., Moreira, M.A. Scapim, C. A., 1997, Avaliação das alterações bioquímicas em sementes de soja durante o condicionamento osmótico. Rev. Bras. Sem., 19: 116-125.

Bray C.M., 1995. Biochemical processes during the osmopriming of seeds; in: Kigel J., Galili G.; Seed development and germination, pp 767-789.

Bray C.M., Davison P.A., Ashraf M, Taylor RM, 1989. Biochemical changes during osmopriming of leek seeds. Ann. Bot. 63:185-193.

Brocklehurst P.A., Dearman J, 1984. A comparison of different chemicals for osmotic treatments of vegetable seed. Ann. Appl. Biol. 105:391-398.

Bruggink G.T., Ooms J.J.J., Van Der Toorn P., 1999. Induction of longevity in primed seeds. Seed Sci. Res. 9:49-53.

Bujalski W., Nienow A.W., 1991. Large-scale osmotic priming of onion seeds: a comparison of different strategies for oxygenation. Sci. Hortic., 46:13-24.

Cantliffe D.J., 1983. Sowing primed seed. Am. Veg. Grower. 31, 42-43.

Chen K., Arora R., 2011. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). Plant Sci. 180:212-220.

Chen, K., Arora, R., Arora, U. (2010), Osmopriming of spinach (*Spinacia oleracea* L. cv. Bloomsdale) seeds and germination performance under temperature and water stress; Seed Sci. & Technol., 38: 45-57.

Crowe J.H., Crowe L.M., Carpenter J.F., Rudolph A.S., Wistrom C.A., Spargo B.J., Anchordoguy T.J., 1988. Interactions of sugar with membranes. Biochim. Biophys. Acta 947:367-384.

Dastur RH, Mone LT, 1958. Scientific aspects of the method of pre-soaking seeds in solution of salts for getting increased yields of crops plants. Indian J. Agr. Sci. 28:1 12.

De Castro R.D., Van Lammeren A.A.M., Groot S.P.C, Bino R.J., Hilhorst H.W.M., 2000. Cell division and subsequent radicle protrusion in tomato seeds are inhibited by osmotic stress but DNA synthesis and formation of microtubular cytoskeleton are not. Plant Physiol., 122:327-336.

Dearman J., Brocklehurst P.A., Drew R.L.K., 1987. Effects of osmotic priming and aging on the germination and emergence of carrot and leek seed. *Ann. Appl. Biol.* 111:717-722.

Dehghani F., Aghaalkhani M., Daneshian J., Rahmati E.; The osmopriming improved germination parameters of water deficit stress driven soybean seeds in low temperature condition. Tropentag, October 5-7, 2011, Bonn “Development on the margin”.

Dell'Aquila A., Bewley J.D., 1989. Protein synthesis in the axes of Polyethylene Glycol treated pea seeds and during subsequent germination. *J. Exp. Bot.* 40:1001-1007.

Dell'Aquila A., Taranto G., 1986. Cell division and DNA-synthesis during osmopriming treatment and following germination in aged wheat embryos. *Seed Sci. Technol.* 14:333-341.

Di Girolamo G., Barbanti L., 2012; Treatment conditions and biochemical processes influencing seed priming effectiveness *Italian Journal of Agronomy* 7e25: 178-188.

Dursun, A., Ekinici, M. (2010) Effects of different priming treatments and priming durations on germination percentage of parsley (*Petroselinum crispum* L.) seeds. *Agricultural Sciences*, 1, 17-23.

Ellis RH, Hong TD, 1994. Desiccation tolerance and potential longevity in developing seeds of rice (*Oryza sativa* L.). *Ann. Bot.* 73:501-506.

Evenari M., 1980; The history of germination research and the lesson it contains; *Israel Journal of Botany*, 29: 4-10.

Farooq M., S.M.A. Basra, H. Rehman, N. Ahmad, B.A. Saleem 2007; Osmopriming improves the germination and early seedling growth of melons (*cucumis melo* l.) *Pak. J. Agri. Sci.*, 44(3) pp. 529-536.

Fu J.R., Lu X.H., Chen R.Z., Zhang B.Z., Liu Z.S., Cai C.Y., 1988; Osmoconditioning of peanut (*Arachis hypogea* L.) seeds with PEG to improve vigour and some biochemical activities. *Seed Sci. Tech.*, 16, 197-212.

Giulianini D., Nuvoli S., Pardossi A., Tognoni F., 1992: Trattamenti pregerminativi di semi di pomodoro e peperone. *Colture protette*, 6: 73-79.



Gurusinghe S, Bradford K.J., 2001. Galactosyl-sucrose oligosaccharides and potential longevity of primed seeds. *Seed Sci. Res.* 11:121-133.

Gurusinghe S., Powell A.L., Bradford K.J., 2002. Enhanced expression of BiP is associated with treatments that extend storage longevity of primed tomato seeds. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 127:528-534.

Han Y.M., 2003. Germination and health of primed onion (*Allium cepa* L.) seeds after two months storage. MSc thesis. A. Cieszkowski Agricultural University in Poznań.

Harris, D., Tripathi, R.S., Joshi, A., 2000, On farm seed priming to improve crop establishment and yield in direct-seeded rice, in IRRI: International Workshop on Dry-seeded Rice Technology; held in Bangkok, 25-28 January 2000. The international Rice research Institute, Manila, The Philippines, p.164.

Hennart J. W., 1983: Osmopriming of pepper seeds. *Capsicum Newsletter*, 2: 116-118.

Heydecker W, Coolbear T, 1977. Seed treatments for improved performance- survey and attempted prognosis. *Seed Sci. Technol.* 5:353- 425.

Horbowicz M., Oberdorf R.L., 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence of flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Sci. Res.* 4:385-405.

Jafar M. Z., Farooq M., Cheema M.A., Afzal I., Basra S. M.A., Wahid M. A., Aziz T., Shahi M.; 2012. Improving the Performance of Wheat by Seed Priming Under Saline Conditions, *Journal of Agronomy and Crop Science* 198: 1, pp 38–45.

Khan A.A., 1992, Preplant physiological conditioning. *Horti. Rew.*, 13: 131–181.

Khoshvaghti H., Hoseini M., Baser-Kouchehbaghs S., 2013. Does priming improve dill (*Anethum graveolens* L.) seed germination and yield? *International Journal of Biosciences* Vol. 3, No. 7: 126-131.

Kraak H.L., Weges R. 1989. Storability of primed lettuce seed. P. 43 in *Proc. 3rd Int. Workshop on Seeds*, Williamsburg, VA, USA.

Lantieri S., Saracco F, Kraak HL, Bino RJ, 1994. The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. *Seed Sci. Res.* 4:81-87.

Leprince O, Hendry GAF, McKersie BD, 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Sci. Res.* 3:321-246.

Lopes H. M., Rossetto C. A. V., Carneiro V., 2000, Embebição de sementes de cenoura (*Daucus corota* L.) em diferentes potenciais osmóticos por dois métodos. *Rev. Bras. Sem.*, 22: 81-87.

Matthews S., Powell A.A., 1988, Seed treatments: developments and prospects. *Outlook on Agriculture* 17: 97–103.

McDonald M.B., 2000. Seed priming. In: Black M., Bewley J.D (eds.), *Seed technology and its biological basis*. Sheffield Academic Press, Sheffield, UK, pp 287-325.

Michel B.E., Kauffmann M.R., 1973. The Osmotic Potential of Polyethylene Glycol 6000. *Plant Physiol.* 51:914-916.

Moghanibashi M., H. Karimmojeni, P. Nikneshan, Behrozi D., 2012. Effect of hydropriming on seed germination indices of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under salt and drought conditions *Plant Knowledge Journal Australia*, 1(1): 10-15.

Mukarati T. H., Rukuni D., Madhanzi T., 2013; Influence of temperature on germination performance of osmoprimed flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds; Afr. J. Agric. Res. 8(49), 6615-6624.

Nath S, Coolbear P, Hampton JG, 1991. Hydration-dehydration treatments to protect or repair stored “karamu” wheat seeds. Crop Sci. 31:822-826.

Nath S, Coolbear P, Hampton JG, 1991. Hydration-dehydration treatments to protect or repair stored “karamu” wheat seeds. Crop Sci. 31:822-826.

Nath S., Coolbear, P., Hampton J. G., 1991, Hydration-dehydration treatments to protect or repair stored Karamu wheat seeds. Crop Sci., 31: 822-826.

Nematollahi, E., Bannayan, M., Souhani Darban, A., Ghanbari, A., 2009. Hydropriming and osmopriming effects on cumin (*Cuminum Cyminum* L.) seeds germination. World Acad. Sci. Eng. Technol. 57, 526–529.

Noorbakhshian S.J., Nabipour M., Meskarbashee M., Amooaghai R., 2011; Optimization of Hydro- and Osmo-priming in Different Seed Size of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop), Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(11): 1236-1244.

Noorbakhshian S.J., Nabipour M., Meskarbashee M., Amooaghaie R., 2011; Optimization of Hydro- and Osmo-priming in Different Seed Size of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) Aust. J. Basic & Appl. Sci., 5(11): 1236-1244.

Obendorf R.L., 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. Seed Sci. Res. 7:63-74.

Osborne D.J., 1983. Biochemical control of system operating in the early hours of germination. Can. J. Bot. 61:3568-3577.

Ozbingol N., Corbineau F., Groot S.P.C., Bino R.J., Côme D., 1999. Activation of the cell cycle in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds during osmoconditioning as related to temperature and oxygen. Ann. Bot. 84: 245-251.

Parera C.A., Cantliffe D.J., 1992. Enhanced emergence and seedling vigor in shrunken-2 sweet corn via seed disinfection and solid matrix priming. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 117:400-403.

Pooja M, Venkateswaran K, Kumari K.V.S., Keshavulu K., 2013; Storability of rimed seeds of brinjal (*Solanum melongena* L.); Indian Journal of Plant Genetic Resources 26 (2) 120-123.

Powell, A.A., Yule, L.J., Jing, H.C., Groot, S.P.C., Bino, R.J., Pritchard, H.W. (2000) The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations. Journal of Experimental Botany 51, 2031–2043.

Ranjit Mereddy, Luguang Wu, Stephen W. Hallgren Yaying Wu Kenneth E. Conway (2000) Solid Matrix Priming Improves Seedling Vigor of Okra Seeds Proc. Okla. Acad. Sci. 80:33-37.

Redfearn M, Osborne DJ, 1997. Effects of advancement on nucleic acids in sugarbeet (*Beta vulgaris*) seeds. Seed Sci. Res. 7:261-267.

Saber, Pirdashti, Heidarzade; 2012, Osmopriming and hydropriming effects on seed and seedling parameters of two rapeseed (*Brassica Napus* L.) cultivars; Intl. J. Agric: Res & Rev. Vol., 2 (5), 547-554.

Selvarani, Umarani, R, 2011; Evaluation of seed priming methods to improve seed vigour of onion (*Allium cepa* cv. aggregatum) and carrot (*Daucus carota*); Journal of Agricultural Technology, 7(3): 857-867.

Simon E.W., 1984, Early events in germination. p. 77–115 In: Murray D.R. Seed Physiology, Vol. 2, Germination and reserve mobilization. Academic Press, Orlando, FL.

Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, van Houwelingen AMML, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SPC, van der Geest AHM, 2005. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. Plant Physiol. 137:354-368.

Tabatabaei S.A., 2013; The effect of salicylic acid and gibberellin on enzyme activity and germination characteristics of wheat seeds under salinity stress conditions; Intl J Agri Crop Sci. Vol., 6 (5), 236-240.

Taylor A.G., Allen P.S., Bennet M.A., Bradford K.J., Burris J.S., Misra M.K., 1998. Seed enhancements. Seed Sci. Res. 8:245-256.

Taylor AG, Allen PS, Bennet MA, Bradford KJ, Burris JS, Misra MK, 1998. Seed enhancements. Seed Sci. Res. 8:245-256.

Taylor AG, Allen PS, Bennet MA, Bradford KJ, Burris JS, Misra MK, 1998. Seed enhancements. Seed Sci. Res. 8:245-256.

Thornton J.M., Collins A.R.S, Powell A.A., 1993. The effect of aerated hydration on DNA synthesis in embryos of Brassica oleracea L. Seed Sci. Res. 3:195-199.

Varier A., Vari A.K., Dadlani M. 2010. The subcellular basis of seed priming. Curr. Sci. India 99:450-456.



Welbaum GE, Bradford KJ, 1990. Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.). IV. Characteristics of the perisperm during seed development. *Plant Physiol.* 92:1038-1045.

Wittington, W. J., 1978, Genetic aspects of final emergence and rate of emergence, *Seed Abstract*, 2: 167.

Wood I.P. & Hay F.R., 2010; Priming increases the storability and changes the water sorption properties of *Rhododendron griersonianum* seeds. *Seed Science and Technology* 38: 682-691.